

# METHODS OF IMPROVING ALLOGRAFT OR XENOGRAFT TOLERANCE BY ADMINISTRATION OF AN LFA-3 OR CD2 BINDING PROTEIN

Publication number: JP7502495T

Publication date: 1995-03-16

Inventor:

Applicant:

Classification:






- international: A61K38/00; A61K31/573; A61K38/17; A61K39/395;  
A61K45/00; A61P9/00; A61P13/12; A61P37/00;  
A61P37/06; A61P43/00; C07K14/705; C07K16/28;  
A61K38/00; A61K45/00; A61K31/57; A61K38/00;  
A61K38/17; A61K39/395; A61P9/00; A61P13/00;  
A61P37/00; A61P43/00; C07K14/435; C07K16/18;  
A61K38/00; (IPC1-7): A61K39/395; A61K38/00;  
A61K39/395

- european: A61K38/17C; C07K14/705B10; C07K14/705B22;  
C07K16/28A10; C07K16/28A22

Application number: JP19920507247T 19921006

Priority number(s): WO1992US08754 19921006; US19910772705  
19911007; US19920850706 19920312

Also published as:

 WO9306852 (A3)  
 WO9306852 (A2)  
 EP0607353 (A3)  
 EP0607353 (A2)  
 JP2003128579 (A)

more >>

Report a data error here

Abstract not available for JP7502495T

Abstract of corresponding document: **WO9306852**

Methods of improving tolerance of transplanted xenograft tissue or allograft tissue in mammals, including humans, by the administration of LFA-3 or CD2 binding proteins.

---

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

int.Cl. <sup>9</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I
6 1 K 39/395		D 9284-4C	
38/00	ABA		
	ABC		
		8314-4C	
		A 6 i K 37/ 02	ABA
			ABC
	審査請求	未請求	予備審査請求 有
			(全 27 頁) 最終

出願番号	特願平5-507247	(71)出願人	バイオゲン インコーポレイテッド
(22)出願日	平成4年(1992)10月6日		アメリカ合衆国 02142 マサチ
用訳文提出日	平成6年(1994)4月7日		ッ州 ケインブリッジ ケインフ
国際出願番号	PCT/US92/08754		センター 14
国際公開番号	WO93/06852	(72)発明者	ウォルナー、バーバラ ビー
国際公開日	平成5年(1993)4月15日		アメリカ合衆国 02139 マサチ
優先権主張番号	772, 705		ッ州 ケインブリッジ センター
優先日	1991年10月7日		ート 7
優先権主張国	米国 (US)	(72)発明者	ベンジャミン、クリストファー
優先権主張番号	850, 706		アメリカ合衆国 01915 マサチ
優先日	1992年3月12日		ッ州 ベヴァリー オーク ヒル
優先権主張国	米国 (US)		2
		(74)代理人	弁理士 三好 秀和 (外1名)
			最終

【発明の名称】 特定種の F A - 3 または C D 2 結合蛋白質を投与することによる同種移植または異種移植性を改善するための方法

【要約】

F A - 3 または C D 2 結合蛋白質の投与により、人を含む哺乳動物に移植した同種移植組織または異種移植組織の寛容性を改善する方法。

前記 LFA-3 結合蛋白質を投与することを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

前記 LFA-3 結合蛋白質が可溶性の CD2 ポリペプチドであることを特徴とする請求項 2 に記載の方法。

前記 LFA-3 結合蛋白質がモノクローナルな抗 LFA-3 抗体であることを特徴とする請求項 3 に記載の方法。

前記モノクローナル抗 LFA-3 抗体が受入番号 AHB 10698 (1E8)、ATCC HB 894 (HC-1B11)、ATCC HB 15 (7A8)、ATCC HB 10696 (8) を有するハイブリドーマから選択されるハイブリドーマにより生成されるか、あるいは、モノクローナル S2/9 であることを特徴とする請求項 5 に記載の方法。

前記モノクローナル抗 LFA-3 抗体が受入番号 AHB 10698 (1E8) を有するハイブリドーマにより生成されることを特徴とする請求項 6 に記載の方法。

前記結合蛋白質が完全体の免疫グロブリン H 鎖の C 領域およびダイマーから選択されることを特徴とする請求項 15 に記載の方法。

前記移植組織が異種移植組織であることを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

前記移植組織が心臓または腎臓の異種移植組織であることを特徴とする請求項 17 に記載の方法。

前記移植組織が同種移植組織であることを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

前記移植組織が心臓または腎臓の同種移植組織であることを特徴とする請求項 13 に記載の方法。

前記哺乳動物が人間であることを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

前記移植組織が前記哺乳動物に移植される前に前記結合蛋白質で被覆されることを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

前記結合蛋白質が体重 1 kg 当たり約 0.1 mg から 1 mg の間の投与量で投与されることを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

前記 LFA-3 結合蛋白質が体重 1 kg 当たり約

1.1 mg から 2.2 mg の間の投与量で投与されることを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

前記 LFA-3 ポリペプチドが SEQ ID NO: 2 の AA<sub>1</sub>-AA<sub>2</sub>、SEQ ID NO: 2 の AA<sub>1</sub>-AA<sub>2</sub>、SEQ ID NO: 2 の AA<sub>1</sub> および SEQ ID NO: 2 の AA<sub>2</sub> から成るポリペプチドの群から選択されることを特徴とする請求項 10 に記載の方法。

前記結合蛋白質が人間化した組換え抗体であることを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

前記結合蛋白質がキメラ組換え抗体であることを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

前記結合蛋白質が Fab フラグメント、F(ab')<sub>2</sub> フラグメント、F(ab')<sub>2</sub> フラグメントおよび抗 LFA-3 または抗 CD2 ポリペプチドの完全な免疫グロブリン H 鎖から成ることを特徴とする請求項 5 または 6 に記載の方法。

前記 CD2 結合蛋白質が体重 1 kg 当たり約 0.1 mg から 2 mg の間の投与量で投与されることを特徴とする請求項 3 に記載の方法。

前記 CD2 結合蛋白質が体重 1 kg 当たり約 0.1 mg から 1 mg の間の投与量で投与されることを特徴とする請求項 26 に記載の方法。

前記結合蛋白質を前記移植の前に 2 日間隔で 1 回投与し、当該移植後に 1 日ないし 1 週間隔で 1 日に 1 回投与することを特徴とする請求項 17 に記載の方法。

前記結合蛋白質を前記移植の前に 2 日間隔で 1 回投与し、当該移植後に 2 日間隔で 1 回投与することを特徴とする請求項 28 に記載の方法。

前記結合蛋白質が前記移植の前に前記移植組織からの組織と同時に投与されることを特徴とする請求項 17 に記載の方法。

前記同時期投与の後に、前記結合蛋白質の投与が行われることを特徴とする請求項 17 に記載の方法。

前記結合蛋白質を前記移植の前に 2 日間

前記異種移植供給源からの細胞が組換えであることを特徴とする請求項30または32に記載の方法。

前記免疫蛋白質が静脈内、筋肉内、皮下、関節内、内、骨髄、経口、鼻所または吸入を介して投与され、とを特徴とする請求項1に記載の方法。

前記結合蛋白質が静脈内または筋肉内に投与され、とを特徴とする請求項33に記載の方法。

前記結合蛋白質が免疫系の免疫調節剤と共に投与することを特徴とする請求項1に記載の方法。

前記免疫調節剤がシクロスポリンであることを特徴とする請求項33に記載の方法。

前記免疫調節剤がプレドニソンであることを特徴とする請求項33に記載の方法。

前記免疫調節剤がプレドニソンおよびシクロスポリンであることを特徴とする請求項33に記載の方法。

前記結合蛋白質がシドA-3結合蛋白質、CD2蛋白質および膜から成る群から選択される1種以上を特徴とする請求項1に記載の方法。

#### 明細書

例のシドA-3またはCD2結合蛋白質を投与することによる同種移植または異種移植の寛容性を改善する方法

出願は1991年10月7日に提出し、現在係属中、特許番号7/772705号の一部継続出願である。

#### 技術的分野

発明は、人間を含む哺乳類において、移植した異種細胞または同種移植細胞の寛容性をシドA-3またはCD2結合蛋白質を投与することにより改善する方法である。

#### 背景

移植細胞とは同一種の中の遺伝的に非同一な個で移植される細胞をいう。このような、心臓、腎臓、肝臓、脾臓、骨髄、肺および皮膚等の組織の移植が種々の末期段階の病気の治療のために医療におい

2のAA<sub>1</sub>-AA<sub>2</sub>、SEQ ID NO<sub>1</sub>-AA<sub>2</sub>およびSEQ ID NO<sub>2</sub>の、から成る群から選択されることを特徴とする請求項3に記載の方法。

45. 前記可溶性シドA-3ポリペプチド、ID NO<sub>2</sub>のAA<sub>1</sub>-AA<sub>2</sub>であることを特徴とする請求項44に記載の方法。

46. 前記結合蛋白質がSEQ ID NO<sub>1</sub>-AA<sub>2</sub>から成ることを特徴とする請求項3に記載の方法。

DOO人の心臓同種移植の受容者の内の僅か入のみが心臓移植を受けているだけである。「心臓移植の危険性」(Ann. Thor. Surg. 47, p. 635 (1988))。

そこで、ドナー組織の他の供給源についてまわっている。このような供給源としては、臓が一割として挙げられ、これは一の種から移植組織をいう。

ただし、これら同種移植および異種移植として、受容者によるドナーの移植組織の拒絶。このような移植における問題は移植でまだ与えられていない免疫システムの一邊の作用による。一般的に、このような免疫系の二つの面がある。1)細胞免疫系：主にT細胞から成り、移植細胞は異種細胞またはウィルスを攻撃して殺す。2)体液性免疫：両面で特異的である抗体を分泌するプラズマ細胞、細胞の延長から成る。

また、当種移植拒絶は、リンパ球等の移植細胞への免疫的浸透 (pyroglucosyl

、このようなＴリンパ球の標的対象物や抗原提示細胞の相互作用は高度に特異的であり、当該Ｔリンパ球上の多くの特異的な抗原受容体の一による標的または抗原提示細胞の表面上の抗原の認識に依存

ようなＴリンパ球や他の細胞の受容体-抗原相互、例えば、抗原-受容体複合体ＣＤ３やＣＤ４、-１、ＣＤ８およびＣＤ２等の補助分子群の種々のＴリンパ球表面蛋白質により容易化されている。さらに、細胞相互作用は標的対象物または抗原提示細胞の表面に表現されるＬＦＡ-３、ＩＣＡＭ-１およびＭＨＣ補助分子によっても助長を受ける。

Ｔ細胞活性についてのＣＤ２とＬＦＡ-３との相互作用はまだ十分に理解されていないが、最近の知見、ＣＤ２（Ｔリンパ球の補助的粘着性分子）とＬＦＡ-３（標的細胞および抗原提示細胞の補助分子）とは特異的な相互作用があり、これによって、Ｔリンパ球が標的細胞や抗原提示細胞に付着することが示唆

されている（参照例：Walton他、「リンパ球相互作用の分子生物学」(Cell, 323, pp. 362-64 (1986))。これまで、二種類のＬＦＡ-３の自然形態が同定されており、膜ＬＦＡ-３の一形態（「トランスメンブリンＬＦＡ-３」）はトランスメンブリン疎水性ドメイン細胞膜内に埋没する。さらに、このＬＦＡ-３のコードするcDNAがクローン化されシーケンスされている（参照例：Walton他、「リンパ球相互作用の分子生物学」(Cell, 323, pp. 362-64 (1986))。また、当膜ＬＦＡ-３の他の一形態はホスファイノシトール（「PI」）含有の脂質との共有結合して細胞膜に埋没する。この後者の形態は「P-ＬＦＡ-３」として示され、当該ＬＦＡ-３のコードするcDNAもまたクローン化されシーケンスされている（Walton他、Proc Natl Acad Sci USA 84/2:181）。

ＣＤ２（T11）分子は95%以上の成熟リンパ球に発現するすべての未成熟リンパ球上に発現される膜表面糖蛋白質である。特異的なモノクローナル抗体を用いた生化学的分析により、ＣＤ２がＴリネー

ムの細胞付着受容体（Ann. Rev. Immunol. 5, pp. 223-56 (1987))としてＬＦＡ-３／ＣＤ２相互作用は、抗原非依存性による複合体形成や赤血球を作るＴリンパ球分化において、Ｔリンパ球と胸腺上皮細胞との相互作用を仲介する（参照例：Seed他、「高解法による、ＣＤ２抗原、Ｔ細胞赤血球受容体のクローニング」(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, pp. 3835-39 (1987))。ＬＦＡ-３は人間の赤血球等の種々の細胞の表面上に見られ、種々のＴリンパ球の相互作用に割をさらに明瞭にするべく、多大な研究の課題である（参照例：Krensky他、「ＬＦＡ-３およびＬＦＡ-２の機能的変種、分布とＣＴＬ-標的相互作用を行う細胞表面抗原」(Immunol. 131(2), pp. 611-18 (1983))、Shaw他、「人間細胞付着因子に用いられる二種類の抗原依存型付着

因子」(Cell, 21:17-22 (1981))、Drownsukocyte Typing III, ed. Mhael, Oxford University Press, pp. 110-12 (1987)、Seed他、「Ｔ細胞DNAの分子クローニングによる人間Ｔリンパ球上の受容体類似構造を呈示するcDNA」(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, pp. 2941-45 (1987))。また、2遺伝子のシーケンスは既に報告されている（参照例：Aruffo, 「高解法による、抗原、Ｔ細胞赤血球受容体の分子クローニング」(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, pp. 3365-69 (1987))、Sayer (1987))。さらに、ＬＦＡ-３結合を介する直接ＣＤ２ポリペプチドが報告されて（T細胞付着WO90/08187）。

また、例えばTS2/18、T11、T11.1等のＣＤ２に対するモノクローナル抗体はTS2/8等のＬＦＡ-３に対するモノクローナル抗体とまた報告されている（参照例：Hugh

ardilisonic)、シクロスポリン(cyclosporin)、アザチオプリンあるいはシクロホスファミド等の薬剤により行われている。また、移植拒絶に対して免疫するTおよびBリンパ球を賦活するために抗失能剤を用いられている。しかしながら、これらの技法による免疫抑制は抗がん剤の付随的毒性を生じることができ、そのため、患者の病態的悪化を多大に引き起こすおそれがある。加えて、上述した免疫抑制技法の長期使用により、他の不利な副作用が生じる。例えば、長期のシクロスポリン治療は腎臓毒、高血圧および悪性腫瘍の発症率を伴う。

同種移植性Tリンパ球の媒介作用はシクロスポリンやメトニシンにより抑制できるが、体液性拒絶が誘発するためには免疫抑制療法が必須になる。なお、図2、このような体液性拒絶に対する治療法は質的である。

それゆえ、今日まで、異種移植または同種移植の寛容を改善することに十分であると見なすことのできる方法や薬剤はなかった。したがって、移植拒絶の拒絶を緩和

し、寛容性または異種移植拒絶の寛容性を改善する方法を開発する。本発明の方法は哺乳動物、特に対して移植拒絶と、シドA-3または白血球とを非与する段階から成る。なお、本発明は、心臓および腎臓の異種移植の寛容性を改善するために用いられる。本方法は移植寛容性の改善のためのこれまでも、偶発的感染のおそれ、腎臓毒、同種移植の諸病気の発生しからの副作用を回避の点で優れている。

## 図面の簡単な説明

第1図および第2図は、抗シドA-3モノクローナル抗体(1E6)を注射した2頭のヒトと非特異的としての同種モノクローナル抗体(MO)を注射した1頭のヒトに對するT細胞濃度とアッセイの結果を示している。シドA-3のCDユニットにより賦活した免疫グロ

ブリンに示す。また、抗シドA-3モノクローナル抗体の注射後の白血球をx軸に示す。

## 図面の詳細な説明

ここで、「シドA-3結合蛋白質」とは、シドA-3と結合可能な1種以上のポリペプチドから成る蛋白質を。なお、このシドA-3結合蛋白質には免疫グロブリン(IgG)、免疫グロブリン(IgM)、免疫グロブリン(IgA)およびそれらの断片断片が含まれる。また、1種以上のポリペプチドから成るシドA-3結合蛋白質の成分ポリペプチドは必要に応じてジスルフィド結合を有していてもよく、また非共有的に結合していてもよい。したがって、当該シドA-3結合蛋白質はIgA、IgG、IgE、IgD、IgMの任(並びにこれらの断片)の完全な免疫グロブリンを含み、該免疫グロブリンのシドA-3結合部位はκ(kappa)鎖またはλ(lambda)鎖であってもよい。さらに、このような結合蛋白質はまたシドA-3結合特性性を保ち、例えば、Fab断片、F(ab')<sub>2</sub>断片、F(ab)

断片に結合する、融合体を含む可溶性CD2ポリペプチドおよびそれらの誘導体を含む。また、CD2ポリペプチドとは、細胞膜内において発現することのないCD2ポリペプチドをいう。可溶性CD2ポリペプチドには、例えば、CD2ポリペプチドを過剰するに十分な塩基濃度を有するシドA-3ポリペプチドや当該塩基濃度が低濃度となるようにCD2ポリペプチドが含まれる。このCD2ポリペプチドは天然のシドA-3ポリペプチド(a)天然の哺乳類CD2のDNAシーケンス(例として、ヒトCD2のDNAシーケンス、あるいは、ヒトの約20%でないシドA-3およびヒトCD2と同様の条件下において上記シドA-3と結合するDNAシーケンスによりコード化された可溶性CD2ポリペプチドは同種であり、それらのいくつかは本明細書に参考文献として引用され、例えば、シドA-3結合蛋白質はCD2断片と可溶性のポリペプチドから成る。なお、

ント、H鎖をノマ-またはダイマー、L鎖をノマ-はダイマー、1鎖のH鎖および1鎖のL鎖から成る一部の完全な免疫グロブリンの一部を含む。に、当該「CD2結合蛋白質」は、CD2に結合能体を含む可溶性LFA-3ポリペプチドおよびその断片をも意味する。また、ここに定義する、該CD2結合蛋白質は可溶性LFA-3ポリペプチドおよびLFA-3 T1P（以下に記載）等グロブリン断片を含む。また、「可溶性LFA-3ポリペプチド」とは細胞膜内においてそれ自体で結合しLFA-3ポリペプチドをいう。このようなポリペプチドには、例えば、当該ポリペプチドを細胞に十分な親和性領域を有さないLFA-3ポリペプチド断片断片が細胞膜となるように膜形成されLFA-3ポリペプチドが含まれる。この可溶性LFA-3ポリペプチドは天然のCD2ポリペプチドに結合する天然の哺乳類LFA-3リチンゲンズSEQ 1のNO:3またはSEQ 1のLFA-3

特許4956281号に記載されている。

また、ここに記載の「人間化組織元抗体」とはDNA技法により生成された抗体を言い、不要な人間の免疫グロブリン鎖またはH鎖の一部または全部が対応する人間以外の哺乳類グロブリン鎖またはH鎖で置き換えられている。

さらに、ここに記載の「ヒト組織元抗体」とはDNA技法により生成された抗体を言い、グロブリン鎖、H鎖あるいはその両方のヒンジ部不変領域の一部または全部が他の免疫グロブリン鎖またはH鎖からの対応する領域に置き換えられている。

また、ここに記載の移植組織の「寛容性の移植拒絶の1種以上の一時的特性の喪失を誘発する」という意味である。このような特性は移植組織に対する免疫応答を明示するものであり、リンパ球等の免疫細胞の当該外組織内への移行、リンパ細胞障害抗体の生成、細胞溶解、アス、尿管炎、出血および線維症等を含む。他の

された寛容性の阻害としては、非免疫抑制の受容体上に比して、受容体における移植組織の生存を抑制することである。

本発明の方法は、人間を含む哺乳類において、同種移植または異種移植組織の寛容性を改変する上で有用である。なお、これらの方法は哺乳動物体に移植組織とLFA-3またはCD2結合蛋白質とを改変する段階からなる。また、このような移植は、心臓、腎臓、肝臓、血液、骨髄、肺、皮膚および臓器を含む供体組織の同種移植および異種移植を含む。さらに、移植組織は上記組織の一部や血液の細胞成分を含む。くは、本発明の方法は心臓の同種移植や異種移植、腎臓の同種移植や異種移植に用いられる。また、この方法は哺乳類のいずれにも、好ましくは人間に、適用することができる。

移植組織の選択においては、種々の因子を考慮が必要であり、これらの因子には、例えば、遺伝的異同性を限り最小にすること、LFA-3遺伝子の発現

のでなければならない。なお、種々の移植に用いるプロトコルが周知となっている。

議論により換気されることを望まないが、本発明の方法において使用するLFA-3および結合蛋白質がT細胞活性を阻害するためには、異種移植組織の寛容性を誘発するための予防を手段になると考えている。当該阻害作用はLFA-3またはCD2結合蛋白質がLFA-3/CD2作用を阻害する時に生じる。しかしながら、本発明する特定のLFA-3およびCD2結合蛋白質LFA-3/CD2相互作用を阻害せずにT細胞阻害してもよい。

すなわち、本発明の方法において用いる特定のLFA-3およびCD2結合蛋白質はT細胞活性を阻害するものである。

なお、本発明の特定のLFA-3またはCD2結合蛋白質による方法の有用性は、LFA-3/CD2相互作用を阻害する能力やT細胞活性またはこれらの阻害能力をアッセイすることにより容易に検出が可能である。

させる等の幾つかの既知の方法によりアッセイすることが出来る。また、該融合特性は酵素によりラベル化し、  
相当な二次的抗体を用いてもアッセイすることが可能  
である。さらに、Seed値 (Proc. Natl. A  
cad. Sci. USA, 84, pp. 2385-59  
[987]) において記載されるようなロゼット融合  
アッセイも使用することができる。

また、シプA-3およびCD2結合蛋白質のT細胞活  
性を阻害する能力は従来のT細胞活性アッセイのいずれ  
により決定することができる。なお、これらは、例え  
ば、分化促進因子(マイトゲン)に応じてT細胞の増殖  
と細胞分化を阻害する結合蛋白質の能力や、他の細胞  
分化蛋白質に対してモノクローナル抗体を反応化する能  
力(参照例: Moltingon, 「CD2の構造的特  
性」 (Immunological Rev., 11  
pp. 111-44 (1988)) を評価するア  
ッセイを含む。

3 (1982)) により生成されるモノクローナル  
シプA-3抗体を用いることがより好ましい。さら  
にも好ましくは、受入番号ATCC HB 108  
(IE6) を有するハイブリドーマにより生成され  
るモノクローナル抗シプA-3抗体を用いることである。  
また、抗CD2抗体のうち、好ましいモノクローナル  
抗体は、TS2/18 (Sánchez-Madrid  
同上 (1982)) を含むT11; エピトープ抗体  
として知られるモノクローナル抗体を含む。

このようなモノクローナル抗体を生成する技術は周知  
であり、簡単に言えば、不死細胞系(一般に骨髓腫細胞  
系)の抗原から成る標品 (preparation)  
の免疫化(接種)した哺乳動物体のリンパ球(一般  
に脾細胞)に融合し、結果として生じるハイブリド  
ーマ培養上清を当該抗原に対する抗体についてスク  
リーニングする(参照: Kohler他, 「所定特異性  
融合細胞分泌抗体の連続培養」 [Nature, 25  
pp. 495-97 (1975)])。なお、本発  
明の目的に有用な免疫原はシプA-3抗原またはCD2  
抗原、並びに、シプA-3、CD2、またはこれら

(truncated) 形態が含まれる。

## A. 抗体

本発明において有用なシプA-3および  
シプA-3は、モノクローナル抗体、組換え抗体  
系抗体、人間化組換え抗体、およびこれらの  
部分を含む。好ましくは、当該抗体はモノ  
クローナルである。

なお、受入番号ATCC HB 108  
, ATCC HB 10894 (HC-1  
TCC HB 10605 (7A6)、お  
HB 10595 (8D8) を有するハ  
(細胞系) の数から選択されたハイブリ  
ドは、TS2/18として知られるモノク  
ロナル (Sánchez-Madrid他, 「人  
ア-3結合の細胞増殖を伴う三種の異なる抗  
体1、LFA-2およびLFA-3」 [Pr  
i. Acad. Sci. USA, 79, p

質等(例: 以下に記載するシプA3T1P  
-6、CD2またはこれらの部分の抗原体

なお、免疫反応は標準的技法により行う。  
単位投与および接種方法は抗原組成される  
抗原、免疫状態、体重等に依存する。一般に、  
哺乳動物から血液が採取され、適当なスク  
リーニングアッセイを用いて特別な抗体について各個体  
が評価される。例えば、それぞれの細胞  
系A-3およびCD2の存在から生じる単  
一のジュルカット細胞のロゼット形成を阻止  
する血清の能力をインビトロにおけるT細胞  
の能力、あるいは、細胞間能力をスクリーニ  
ングすることにより、有用な抗シプA-3お  
びにシプA-3抗体が同定される。一般に、ハイブリド  
ーマに使用されるリンパ球は、接種されて上記  
のスクリーニングアッセイを用いてその効率が所望の抗  
体について既に阻害であると判定された哺乳動物  
から得られる。

一般に、不死細胞系(例: 骨髓腫細胞系)  
から哺乳動物からリンパ球細胞として評価する。

スクリーニングにより、所望の抗体を生成するハイ  
ーマが検出される。また、有用なハイブリドーマ  
は「細胞活性の相互作用力についてのスクリーニ  
ンを行うことができる。なお、モノクローナル  
抗体のために限界第法によるハイブリドーマ培養  
クローニングが一般に行われている。

に、抗LFA-3および抗CD2モノクローナル  
生成するために、上記スクリーニングアッセイに  
関連と判定されたハイブリドーマ細胞を、所定の  
地において、当該ハイブリドーマ細胞がモノク  
ル抗体を当該培養増殖中に分泌するに十分な時間  
下で培養する。このようなハイブリドーマ細胞培  
養の組織培養技術および培養増殖は周知である。  
上記の如き細胞を除いたハイブリドーマ培養の上  
は改良することができ、所望の抗体を必要に応じ  
の方法によりさらに精製することも可能である。  
、当該所望の抗体はブリスタン12、8、10、  
オトラメチルペンタデカン（アルドリッヂケミカ

なる表現ベクタに挿入することもできるが、通常、  
表現ベクタに挿入される。

場合、原核または真核宿主細胞が変形宿主として  
きる。なお、真核宿主細胞は原核細胞に代して選  
りたためれば免疫学的に特異的な抗体を結合させ  
やすいので、当該真核宿主細胞を使用するのの方  
いい。しかしながら、周知の方法により、不適切  
たためにより不特異性となつたいかなる抗体も再生  
とが可能である（KimおよびBaldwin、  
白質の折りたたみ反応における特異的中間体およ  
質の折りたたみ機構」（Ann. Rev. Biochem. 51, pp. 459-89 (1982)）、  
、該宿主細胞は鎖ダイマーまたはH鎖ダイマー  
発明に有用な完全抗体の部分を生成することが可  
る。

に、上述の方法における種々の変形もまた本発明  
で有用となる。例えば、抗LFA-3または抗CD  
体の鎖またはH鎖のいずれか（両方ではない）  
トするDNAを用いて宿主細胞を形質転換するこ  
題である。また、例えばDNA断片を、LFA-

また、本発明において有用なLFA-3およ  
結合蛋白質は、所望の抗体の免疫グロブリンL  
H鎖をコードするDNAにより形質転換した宿  
あるいは、これらのLFA-3またはCD2結  
より生成した組換え抗体であってもよい。この  
換え抗体は周知の遺伝子工学的技術により生成  
ができる（参照：本明細書において参考文献  
載の米国特許第4818397号）。

例えば、該組換え抗体は、本発明において有  
を生成するハイブリドーマから所望の抗体の免  
リン鎖およびH鎖をコードするとDNAまた  
DNAをクローニングすることにより生成する  
きる。その後、これらのポリペプチドをコード  
DNAまたはゲノムDNAは表現ベクタ内に挿入  
NAシーケンスの両方が一以上の転写および翻  
訳シーケンスに連結する。さらに、これらの発  
および表現制御シーケンスから上記の表現宿主  
して適合性のあるものが選ばれる。DNAの両

成することができ、この場合、1本のH鎖およ  
し鎖がLFA-3またはCD2に対して特異的  
かつ、他のH鎖および鎖がLFA-3または  
他の抗原若しくはLFA-3またはCD2の他  
ープに対して特異的である。

また、所望の免疫グロブリン鎖およびH鎖  
するDNAから受ける適当な表現ベクタを用いて  
を形質転換することにより、モノクローナル抗体  
ることができる。この場合、当該鎖および/  
鎖のヒンジ領域および不変領域をコードするD  
べてまたは一部が異なる種の免疫グロブリン鎖  
H鎖の対応する細胞からのDNAにより置き換  
いる。元の組換え抗体が人間のものではなく、  
FA-3または抗CD2抗体が人間に投与され  
人間のシーケンスに対応する置き換えを行うこ  
しい。創作的なモノクローナル抗体としては、マ  
ウス抗体と人間のヒンジ領域および不変領域とを  
のが挙げられる（参照：米国特許第481839  
およびMoffitt et al.、「モノクローナル抗体免  
不変領域ドメインを含むマウス抗体結合ドメ

特許第0239400号) )。

また、完全でない抗LFA-3および抗CD2抗体も本発明において有用である。なお、このような抗体は上述の抗体のいずれかから誘導することができる。例えば、上述の抗体から誘導する抗原結合フラグメントは完全長モノマー、ダイマーまたはトリマーポリペプチドがそれ自体で有用である。この型の有用な結合蛋白として、Fabフラグメント、Fab'フラグメント、(ab')<sub>2</sub>フラグメント、F(v)フラグメント、単モノマーまたはダイマー、鎖モノマーまたはダイマー、1個のH鎖および1個のL鎖から成るダイマー等挙げられる。

当該抗体フラグメントは、例えば、ペプシンまたはパイン等のプロテアーゼを用いる完全抗体の切断、および当該切断生成物の還元剤による処理等の化学的方法によっても生成することができる。また、有用なフラグメントを部分切除したH鎖および/またはL鎖の遺伝子より影響転換した宿主細胞を用いることによって生成

することも米国特許第4956283号および同時に共同譲渡されている米国特許出願01/6879号および07/770957号に記載されている。し可溶性LFA-3ポリペプチドとしては、SEQ ID NO: 2のAA<sub>1</sub>-AA<sub>12</sub>、SEQ ID NO: 2のAA<sub>1</sub>-AA<sub>10</sub>、SEQ ID NO: 2のAA<sub>1</sub>およびSEQ ID NO: 2のAA<sub>10</sub>から成るポリペプチドが含まれる。SEQ ID NO: 2をコードするDNAシーケンス(すなわちQ ID NO: 1)から成るバクテリオファージ入器質ATCC75107においてアノリカンタイムチャートコレクション(Rockville, Maryland)に記載されている。

可溶性LFA-3ポリペプチドはまたPCT特許出090/02181号に記載されるもの等のLFAのPI遊離形態から誘導できる。なお、当該PI遊離LFA-3をコードするDNAシーケンス(すなわちQ ID NO: 9)から成るベクターが受入番号C68788においてアメリカンタイプカルチャーコレクション(Rockville, Maryland)

: Ward他、(大腸菌から分泌した単一リン可変ドメインの範囲における結合特異性、841, pp. 544-46 (1981)他、(モノクローナルな抗体抗体の大腸菌における免疫学的な範囲におけるH鎖可変領域特異性cDNAライブラリProc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86: 728-32 (1989)) )。

B. 可溶性CD2およびLFA-3ポリペプチド  
本発明の方法において有用なLFA-3結合蛋白質は可溶性CD2およびLFA-3を含む。このうち、可溶性LFA-3はより好ましい。

可溶性LFA-3ポリペプチドはLFA-3膜タンパク質形態、特に、細胞外ドメイン(Q ID NO: 2のAA<sub>1</sub>-AA<sub>12</sub>)から成ることができる。このようなポリペプチドは

膜タンパク質形態から誘導するものと同一である。また、可溶性CD2ポリペプチドは完全に、その細胞外ドメイン(例: SEQ ID NO: 1のAA<sub>1</sub>-AA<sub>11</sub>)から誘導することが可能なポリペプチドはCD2の細胞外ドメインおよび一部分から誘導できる。好適な可溶性ポリペプチドが参考文献でもあるPCT WO 87に記載されている。

本発明において有用な可溶性ポリペプチド誘導において知られる種々の方法により行われる。例えば、膜タンパク質を完全な膜タンパク質またはCD2分子、若しくはL遊離LFA-3分子から、エクソペプチド結合した特定のエンドペプチダーゼ、エンドペプチダーゼの両方による蛋白質分解による。このような完全なLFA-3分子、CD2分子は従来の方法によりその天然の形で誘導することができる。また、該完全なLFA-3またはCD2はcDNAを用いて既知の塩基配列を生成することもできる(制限例: Ward)

ドまたは可溶性CD2ポリペプチドをコードするシーケンスはオリゴヌクレオチドシンセサイザの化学的取扱いにより合成することができる。このオリゴヌクレオチドは所望の可溶性LFA-3ポリペプチドや可溶性CD2ポリペプチドのアミノ酸シーケンスに基づいて設計される。さらに、該所望のポリペプチドに対する特定のDNAシーケンスのコード化は、制限エンドヌクレアーゼフラグメントの単離や所定のPCR合成によって、完全なDNAシーケンスを得ることができる。

これらの可溶性LFA-3およびCD2ポリペプチドは形質転換した宿主細胞の発酵や培養により単離される。また、種々の従来法のいずれかによって精製することが可能である。発酵者においては、最も好適でありおよび精製法を選択することが可能である。

このDNA技法は20個以上のアミノ酸シーケンスを含む有用な可溶性CD2ポリペプチドや可溶性LFA-3ポリペプチドを生成する好ましい方法であるが、

例として、404-07 (1990) ) )。

### 可溶性LFA-3およびCD2結合蛋白質

この方法において有用なものとしては上述のLFA-3およびCD2結合蛋白質の融合体や混成体を含むものも含まれ、当該LFA-3やCD2結合蛋白質は1種以上の同一または異なるLFA-3およびCD2結合蛋白質、薬剤あるいはこれらの両方に機能させる（化学的結合あるいは遺伝的融合等による）。

このような融合蛋白質の1種は、2種以上のLFA-3またはCD2結合蛋白質（同一種または異なる種）の架橋により生成される。この場合に関連するものは、ヘテロ二官能性の、適当なスペーサに付した2種の異なる反応基を有するもの（例：m-クロロベンゾイル-N-ヒドロキシスукシニミド）や、ホモ二官能性のもの（例：スベリン酸、ジシイミフル）が含まれる。また、連結剤として、ペルフルオロカルボン酸（Pierce Chemical Company, Rockford, Illinois）

本発明の方法において有用なLFA-3およびCD2結合蛋白質には、当該LFA-3およびCD2結合蛋白質が含まれる。このような物質はペプチド、単糖化合物または非ペプチド化合物であり、CD2-3融合物質）やLFA-3（CD2融合物質）として、CD2/LFA-3相互作用、T細胞活性化はこれらの両方を阻害する。

このような融合物質は複数のペプチド（例：個々のアミノ酸残基）、半ペプチド化合物、非ペプチドまたは有機化合物を合成した後、CD2/LFA-3相互作用の阻害能力またはT細胞活性化の阻害能力はこれらの両方について当該化合物をスクリーニングすることにより生成することかできる（参照：米国特許4,838,002号、ScottおよびSmith、ヒトT細胞アライザを用いたペプチドリガンド（Science, 249, p.p. 886-890）、Devlin氏、「ランダムペプチドリ：特定蛋白質結合分子の供給源」（Science

）をコードするDNAは所望のポリペプチドまたは可溶性LFA-3ポリペプチドをコードする下流で選択する。もしもこのような選択が適当な細胞において実現されれば、当該細胞はP1シーケンスを認識してP1をポリペプチドに共有する。而して、該P1の疎水性によりポリペプチド凝集体が形成される。

また、1種以上の薬剤に連結したLFA-3とCD2結合蛋白質（例：融合または融合蛋白質）用である。この場合、有用な薬剤としては、LFA-3やCD2以外のポリペプチドに対して特異的な生物学的に活性なペプチド、ポリペプチドおよび糖が挙げられる。また、その他の有用な薬剤例えば、シクロスポリンA、ブレグニオン、FK506（トレモセート）、ステロイドおよびレチノイド阻害剤が挙げられる。

また、好ましい派生的融合蛋白質としては、強により生成されたポリペプチドがあり、この融合LFA-3ポリペプチド、可溶性CD2ポリペプチドまたはペプチジルCD2やペプチジルLFA-3

SEQ ID NO: 2をコードするDNAシーケン  
(すなわちSEQ ID NO: 1) から成るバクテ  
リオファージがアメリカンタイプカルチャーコレクション  
(Rockville, Maryland) に受入番  
A T C C 7 5 1 0 7 で寄託されている。

この種の最も好ましい融合蛋白質は、成熟したLFA-3  
のCD2細胞のアミノ酸から成るアミノ末端、内部結合  
スルフィド結合に関与すると考えられる2超のシステ  
ン残基を含む人間IgG、ヒンジ領域の10個のアミ  
ノ酸から成るC末端、および人間IgG14鎖の不変ド  
メインのC<sub>H</sub>2およびC<sub>H</sub>3領域(例: SEQ ID  
NO: 3)を含む。以下、このような融合蛋白質を「L  
FA3TIP」と称する。典型的なLFA3TIPをコ  
ードするプラスミドpSAB152がアメリカンタイプ  
カルチャーコレクション(Rockville, Mar  
yland) に受入番号A T C C 6 8 7 2 0 で寄託され  
ている。また、当該pSAB152の挿入のDNAシー  
ンスはSEQ ID NO: 7である。

ーナル抗血清を用いてウェスタンブロット上で検出さ  
る後、山羊の抗ラビIgGでラベル化される。この  
CD2細胞の増殖されたLFA3TIPはジスルフィ  
ド結合により連結した2種のモノマーLFA-3-Ig  
G蛋白質の二量体であった。

#### 本発明による薬剤組成物および方法

本発明による方法は哺乳類動物に移植組織と1種以上  
の宿主を含むLFA-3またはCD2結合蛋白質を投  
与することにより同種移植組織または異種移植組織の寛  
容性を改善する。このLFA-3またはCD2結合蛋白質  
は薬剤組成物の一部として投与することらできる。

すなわち、有用な薬剤組成物は宿主を含む1種以上  
のLFA-3またはCD2から成り、一般に、薬学的に  
許容可能なキャリア内に収容されている。なお、「薬学  
に許容可能なキャリア」とは投与体である患者におい  
てアレルギー反応や不都合な作用を強めないキャリアを  
表す。

この場合、薬学的に許容可能な好適キャリアとして、  
例えば、水、生理食塩水、リン酸緩衝バッファー組成した

タインAセファロース4B (Sigma,  
Is. Missour) のクロマトグラ  
される。その後、結合した蛋白質は溶出さ  
ース(Superose)-12 (Phar  
mac. Biotech, New  
York) のゲル濾過クロマトグラフィにかける。  
このスーパーコース-12のフラクショ  
ン含有蛋白質のLFA3TIPを含む。この  
析(SDS-PAGE)およびウェスタン  
blotting) 分析により決定  
別(Towbin他、(Proc. Natl  
Sci. USA, 74, pp. 4350-  
9);)、元体(A Laboratory  
I, pp. 474-610 (Cold S  
Harbor Laboratory (1  
当該フラクションは集められ、YMB05  
(Centricon) (AMICON)  
される。該LFA3TIPはうきぎ両LF

より組成されているもよい。

このような本発明に有用なLFA-3ま  
たは蛋白質や組織物は上述の如く定義した同  
種移植組織に対する寛容性を改善し得る量と  
いて「効果的な量」で投与されることが好

なお、当業者においては、当該効果的な  
量やCD2結合蛋白質が、とりわけ、投与  
単位投与量、該LFA-3またはCD2結  
合の薬剤との組み合わせで投与されるか否  
に依り、投与される特定の  
量はCD2結合蛋白質の治療的並びに予防  
び、その進歩の半減期に依存することは明

さらに、上記薬剤組成物は一般的に免疫  
使用することとも可能である。これらは、例  
ズオリン、アザチオプリン、および、メチ  
ロン アセテート (Depo-Medrol  
プレドニゾン、サトリウム、スクシネー  
medrol) 等のステロイド、および  
哺乳動物における免疫応答を抑制するに効  
用とされるブレンドンを含む。例として、

、上記薬剤組成物は癌の治療剤または予防剤か  
れていてもよい。また、これらのLFA-3ま  
た結合蛋白質やその他の免疫剤は単一の複合  
態であってもよい。なお、当該2種の化合物の  
当業界において周知の標準的製法技術によって  
また、同一分子は相換え融合蛋白質の形態をも  
。

の付加的な免疫抑制剤、治療剤または予防剤は  
癌形態において該LFA-3またはCD2結合  
共に投与することができる。また、該LFA-3  
結合蛋白質とは別にかつこれと同時に複合的  
において投与することもでき、さらに、これら  
9々にかつ連続的に投与する複合的投与形態に  
変することもできる。このような組み合わせは  
免疫抑制剤や治療剤または予防剤の少量の投与  
有利である。

上記の薬剤組成物としてLFA-3またはCD2結  
合蛋白質の形態を採り得る。例えば、錠剤、乳剤、

それがなくなるまで1日当たり約1回投与され  
、該LFA-3またはCD2結合蛋白質または  
投与期間は該哺乳動物体における移植組織の許  
存する。移植組織の一般的な簡便的な検査は移植  
組織により変化する。しかしながら、発熱、  
組織機能障害等が当該組織の典型的臨床兆候と  
られる。さらに、該組織機能障害の兆候は移植  
組織に依るが、当業者において周知でありか  
れている指標により特徴付けられる。

経過は、リンパ球の浸透度を決定するための切  
バイオブレーや経皮的内心筋バイオブレー等の  
レー、リンパ球細胞障害抗体生成の程度を決定  
の血液アッセイまたは凝合リンパ球反応等の種  
により計測することができる（参照例：Kre-  
格、(J. Immunol., 131, pp.  
18 (1983)、Bradley、和臨免疫  
で著記された方法における「凝合リンパ球反応」  
hell and Shilling, ed.),  
62-64 (W. H. Freeman and  
Co., San Francisco, 1980) )

上記薬剤組成物はその活性成分の放出を制御し、  
受容体におけるそれらの存在期間を延長するよう  
することができる。このための好適な薬剤放出  
が数多く知られており、例えば、ヒドロゲル、エ  
シメチルセルロース、マイクロカプセル、リボン  
マイグロエマルジョン、微小球等の態様が挙げら  
れる。

本発明によれば、移植組織と特定のLFA-3  
蛋白質とを受容する哺乳動物体に対して、体重1kg  
当たり約0.01ないし約10mg、より好ましくは  
1ないし約5mg、最も好ましくは約0.1ないし  
1mgのLFA-3結合蛋白質が投与される。

また、移植組織と特定のCD2結合蛋白質とを  
受容する哺乳動物体に対しては、体重1kg当たり約0  
ないし約10mg、より好ましくは約0.01ない  
し約2mg、最も好ましくは約0.01ないし約1mg  
CD2結合蛋白質が投与される。

該LFA-3またはCD2結合蛋白質または延  
投与者の判断において、同種移植または異種移植

本発明の方法は、同種移植組織の場合の好まし  
形態において、移植前に二日間連続して一日当  
たり1回LFA-3またはCD2結合蛋白質を投与  
とから成る。より好ましくは、該LFA-3また  
2結合蛋白質を移植前に二日間連続して一日当  
たり1回投与する。また、移植後に二日間連続して一日当たり1回投与  
する。

また、本発明の方法は、異種移植組織の場合の  
い実施態様において、移植前に、LFA-3また  
2結合蛋白質を供与種移植組織からの組織と配  
与することから成る。ここでの「同時期に (i-  
m p r a c t i c a l l y)」とは、異種移植  
(移植組織以外)からの組織とLFA-3また  
2結合蛋白質との投与については、当該結合蛋白質  
な免疫応答を促進するに効果的なレベルで該  
供給源からの組織に結合するに足る時間内にこ  
投与が行われることを意味する。好ましくは  
結合蛋白質が飽和レベルで該異種移植供給源か  
らに結合する。本発明の好ましい実施態様におい  
て、投与が他方の投与の約0ないし6週間以内

に投与し、おまにその後、一日ないし十日間続けて一日に1回投与する。もしも抗原種移植供給源の型と受容の種とが極めて不一致であれば、上述のスケジュールに従って、LFA-3またはCD2結合蛋白質を二日間続けて一日に1回当該抗原種移植供給源からの組織と同時に投与することが必要になる。好ましい実施態様においては、上述のスケジュールに従って、該結合蛋白質を該同時期投与の後および当該移植の前に5日ないし1日間続けて一日に1回投与する。また、最も好ましく、当該LFA-3またはCD2結合蛋白質と異種移植供給源からの組織との同時期投与を同時に行う。

理論に拘束されるわけではないが、出願人は異種移植供給源からの組織を、当該組織に対して特異的に反応する活性化した細胞の集団の増加を阻害するべく、哺乳動物にLFA-3またはCD2結合蛋白質と同時に投与した。而して、該LFA-3またはCD2の同時期投与は上記特定の異種移植供給源からの細胞により選ばれた抗原の特定の部分的集合に対して寛容性を誘引する。

## 例

### 例1

LFA-3モノクローナル抗体2.5.6およびモノクローナル抗体MOPC2.1の精製

1.E6ハイブリドーマ細胞(ATCC HB 2.083)を40リットルの攪拌ガラス容器(Bellco, 205586000)中で、2%ウシ胎児血清、15μg/mlのストレプトマイシンおよび50μg/mlのゲンタマイシン(GIBCO Life Technologies, Gaithersburg, Maryland)の存在下、RPMI1640培地中において、27°Cで7-10日間培養した。この細胞を除いた培地を100リットルのカーバイ(NALGENE)に入れ、その後、アジ化ナトリウムを加えて最終濃度を0.02%にした。室温で、5μmファイナカートリッジ(Polygard, #CN500136, Millipore, Bedford, Massachusetts)により細胞破片を除いた後、0.2μmファイナカートリッジ(Polygard, #CN303E08, Millipore, Bedford,

Bedford)からの組織として最も好ましい効果を得ながら、これよりも低いあるいは高い投与スケジュールも適用可能である。

該LFA-3またはCD2結合蛋白質を組成物は脾臓、筋肉内、皮下、関節内、経口、局所的または吸入等を介して投与で脾臓内または筋肉内投与が好ましいが、出現する体内における細胞が広範囲であるたにおけるより局所的な投与がより望ましい。

本発明の方法の好ましい実施態様において、物体への移植前に、移植組織の一面に抗原A-3やCD2結合蛋白質が塗られる。骨当乳動脈体への移植前に移植組織の一面にCD2またはLFA-3部位を塗るLFA-3またはCD2結合蛋白質を塗る。

本発明をさらによく理解するために、見説明する。なお、これらの実施例は例示の本発明の範囲をこれに限るものではない。

に濃縮した。この50リットルの細胞を除く濃縮液を2倍量の平衡バッファー(0.15M塩化ナトリウム、pH8.9)で一晩、重力により、80m1のプロテイン(Protein A-Sepharhlaicher and Schuele, New Hampshire)を通し

使用カラムを平衡バッファーで洗浄し、スルホン酸ナトリウム(pH3.0)により抽出した。この抽出フラクションを1/10容積のIM-HEPES(pH7.8)中で、当該フラクションのA280吸光度に当該抽出蛋白質を含むフラクションを集め保存した。このようにしてプロテインA結合部で約200リットルの細胞を除いた培養液。この種の吸光度物を、2リットルのアコン(Acon)攪拌セル中でYM80フィルタN-Danvers, Massachusetts)を用いて溶解し、粗み合わせ、約10mg/濃縮した。その後、この濃縮物を5分間し

ai Corporation, St. Louis, Missouri) から購入した飲水から精製し、ろち、蒸餾水を、3M グリシン、1.5M 塩化ム、pH 8.9 の「プロテイン A ローディングバッファ」(Protein A loading buffer) 中に希釈し、室温で 25 ml のプロテイン A ロース (Schleicher and Schell, Keene, New Hampshire) した。次いで、該カラムを 280 nm における光基線レベルに戻るまで上記ローディングバッファより洗浄した。その後、結合した IgG を 50 mM ナトリウム (pH 3.0) により高容量で洗脱し、緩ゆるリン酸塩バッファで処理した抗原食塩水に 10℃ で一晩透析した。透析後、該 MOPC 21 をリン酸塩バッファで処理した生体食塩水中に膜閉ットルのスーパーコース-6 グル連通カラム (Amacila, Piscataway, New Jersey) 中に通した。次いで、該 MOPC 21

(Lewis, Missouri) を投与した抗体投与の時にそれぞれのヒトから 1 回また紙を採取し、その後、8 日間経けて毎日、各投与回後は血液採取を行った。さらに、最初の投与日目として、8 日目、11 日目および 14 日目採取した。なお、他に記載しない限り、該投与サンプリングのプロトコルを本実験例において記すべきのアッセイにおいて用いた。

## F A-3 モノクローナル抗体 1E6 についての検討

抗 F A-3 モノクローナル抗体の一般的な毒性との身体的条件に關する潜在的効果、血液学、血液化学について評価した。なお、当該検討を各ヒトの一般的な身体的条件は不変であった。苦かつを激な副作用は見られなかった。さらに、および血液化学的にも概ね正常であった。特に、 $Cl^-$ 、 $K^+$ 、クレアチン、血尿酸素、および ALT および AST のレベルはすべて正常な限であった。加えて、血液細胞の数、すなわち、ヘ

ット/ロ 1 以下のエンドトキシンが含まれている分かった。以下、特に記載のない限り、すべての理は室温下で行った。

## 実験例 2

抗 F A-3 抗体モノクローナル抗体 1E6 の投与が免疫機能に關する効果

### A. 投与およびサンプリングのプロトコル

2 頭の異系交配の成育したヒト A および B (Pampanubia) に 5 日間経けて 1 日に 1 回、カテーテル (Portacatheter) によした抗 F A-3 モノクローナル抗体 1E6 を 1 mg/kg で静脈投与した。ヒト A の体重は 1.2 kg あり、ヒト B の体重は 2.5 kg であった。またとして、他の成育したヒト C (体重 0.4 kg) の非特異的なアイソタイプのマウスモノクローナル MOPC 21 (Sigma Chemical

### C. 抗 F A-3 モノクローナル抗体 1E6 および MOPC 21 の血清レベル

抗体投与の 4 時間後に採取した血液から血清をた。さらに、1E6 を投与したヒト (ヒト A およの場合、24 時間の間隔で、抗体投与の直前および 1 日目および 5 日目に血清を採取した。また、8 日目および 14 日目に血清を採取した。次いで、該 MOPC 21 および 1E6 の血清レベルを山羊ウス IgG (Jackson ImmunoResearch, Maitver, Pennsylvania) を塗布したマイクロタイタープレートを使用する SA を用いたマウス IgG レベルの計測により決なお、これらの E 1.3 A は実験例 1 において述うに描製した MOPC 21 および 1E6 を用いてした。また、1 F A-3 に結合可能な 1E6 (す「活性」1E6) の血清レベルを抗 F A-3 の A A A から成る可溶性の抗 F A-3 水リベチ布したマイクロタイタープレートを使用する E 1.3 A によって計測した (参照：米特許第 4,958,2。この E 1.3 A もまた実験例 1 において述べた

の量は405nmであった(データ示さず)。  
 この結果、1E8およびMOPC21の血清レベルは  
 日目および5日目の間(約40-80μg/ml抗約  
 最高となり、8日目および11日目の間で投与前のレ  
 ルに戻った。なお、1E6の投与前24時間の血清レ  
 ルは、1日目ないし5日目に採取した血清の投与前4  
 時間のレベルの60%および80%の間で一貫して減少  
 した。これに比して、MOPC21レベルは24時間後  
 10%および20%の間で減少したのみであった。ま  
 、活性1E6の割合は40%および70%の間で変化  
 した。さらに、株1E6の血清レベルはヒトAに比して  
 ヒトBの方が高く(体重9.5kg対12kg)、これ  
 異なる組織空間分布によるものと考えられる。  
 さらに、処理したヒトの血清における抗1E8抗体の  
 イター値をELISAにより決定した。すなわち、精  
 した1E8をマイクロタイフプレートに結合し、各  
 社の血清を添加処理においてアッセイした。(データ  
 示さず)。

末梢血液単核細胞をFicoll-Hypaque濃  
 度(Pharmacia, Piscataway,  
 ew Jersey)上で当該製造者の指示に従って  
 血から精製した。付着マクロファージを当該単核細胞  
 プラスチック皿上での87℃で45分のインキュベー  
 シンにより除去した。また、非付着のリンパ球を生理的  
 適合性のある培養液(RPM1640, Gibco  
 Life Technologies, Gaithers  
 burg, Maryland)において洗浄した。この  
 後はファクスタ(FACStar, Becton D  
 :kingon Corporation, Monro  
 :view, California)上のFAC  
 3所により最小のマクロファージを含むことがわかっ  
 た。なお、当該検出には、マクロファージ/単核細胞の  
 5数面洗原に特異的な蛍光ラベル化処理した試体を用  
 いた。その後、当該細胞を96-ウェル平底プレート  
 (Immulon 2, 5×10<sup>5</sup> Mβ-グルコブトエタ  
 ・ルおよび非必須アミノ酸を加えたRPM1640  
 Gibco Life Technologies,  
 :thorough, Maryland)にお

D. インビトロでのT細胞の活性化アッセ  
 1E6投与のインビトロにおけるT細胞  
 での効果を決定するために、末梢血液リン  
 抗体投与したヒトから単離して、T細胞活  
 性化およびファクトヘマグルチニンに比した  
 るいは抗CD2モノクローナル抗体の活性  
 アッセイした。なお、これらのアッセイの名  
 義末梢血液リンパ球をFicoll-Hy  
 (Pharmacia, Piscataway  
 Jersey)上で当該製造者の指示に従  
 って単離した。さらに、該末梢血液リンパ  
 イに先立って血清で10%ウシ胎児血清を  
 含養液中で一晩保存した。

1. T細胞依存型B細胞活性化アッセイ  
 T細胞依存型B細胞の免疫グロブリン分  
 化は抗LFA-3抗体により阻止すること  
 (MOPC21を対照として使用)。

いで、ELISAを用いてヒトの免疫グロ  
 中で当該サンプルの上澄み液(上清液)を分  
 場合、アッセイプレートには山羊の抗人間  
 (Jackson ImmunoResearch  
 Malvern, Pennsylvania)に  
 れており、当該グロブリンもまたヒトの免  
 を認識するが、ウシ胎児血清中に存在する  
 ンやマウスの免疫グロブリンには結合しな  
 当該山羊の抗人間免疫グロブリンを塗布し  
 結合した培養上澄み液からの免疫グロブリン  
 の抗人間免疫グロブリン試薬を用いて検  
 該試薬には、酵素であるアルカリ性フォス  
 結合している(Jackson Immuno  
 arch, Malvern, Pennsy  
 。次に、当該結合した免疫グロブリンを  
 スファクラーゼ基質pNPP(パラニト  
 +スファターゼ)による比色変換において  
 することにより定量した。なお、当該培養  
 マックス(ThermoMax; Molecular  
 Devices, Palo Alto, Ca

1 E 8 投与の第2日目に減少し、11日目まで値の約35%に維持した(第1図)。

ヒトAの場合は、1-11日目のIg生成が投与レベルよりも高かった。これは、ヒトBの場合にヒトAの場合は到達した1 E 8 血清レベルが低阻われる。ここで、1ないし4日目に検出したレベルを基準値とすれば、5日目のIg分泌の0%であり、さらに、11日目の阻害は20%(第2図)。

ヒトCの場合は、MOPC 21の投与後、末梢パルスがIg生成のレベルを0日目レベルに比自から11日目の間で増大している。

#### 増殖アッセイ

増殖アッセイにおいては、本発明者は抗CD2-モノクローナル抗体若しくはフィトヘマグルチニン(「F」)を固定化してヒトA、BおよびCから0 E 5日目、8日目、11日目および14日目に増

殖培養した。3日後、当該細胞を1  $\mu$  Ci /ウェルHdTにより18時間ラベル化して採取した。(示さず)。

この結果、ヒトBから得た末梢血液リンパ球はD2モノクローナル抗体の活性化に応じて<sup>3</sup>Hd込量の増加を全く示さず、また、0日目から14日において培養中における増殖活性も極めて低かった。一方、ヒトAから得た末梢血液リンパ球は抗CD2モノクローナル抗体とPHAとに反応を示した。ち、4日目以降、これらの物質に応じた増殖が観察され、少なくとも14日目まで低い増殖率が知れた。

また、MOPC 21の対照であるヒトCから末梢血液リンパ球はすべての条件下においてすべての期に極めて低い増殖活性を示した。

なお、ヒトCのT細胞増殖並びにヒトA、Bからの0 E 5日目の結果の再現性が得られないため、このデータの有意差については明瞭でない。

#### TI P 投与のリンパ球機能に関する効果

##### およびナンブリングのプロトコル

異系交配の繁殖したヒト(A、B & gおよびT、(Papilio enabils)に5日間続けて、回、オートカテーテル(perfusion)により循環した抗LFA3 TTP (Biogen, Cambridge, Massachusetts)を3 mg/kgで静脈投与した。最初の試験にそれぞれのヒトから1日ずつ血液を採取し、5日間続けて毎日、各投与の4時間後に血液採取した。さらに、最初の投与の日を1日目として、10日目、15日目および22日目に血液を採取した。他に特に記載しない限り、当該投与およびリグのプロトコルを本実験例において記載するアッセイにおいて用いた。

#### LFA3 TTP についての毒物学的検討

ヒトA、B、Cの一次的な毒性セグメントの

および血液化学的にも異常であった。特に、Cl<sup>-</sup>、K<sup>+</sup>、クレアチン、血尿酸、および肝ASTおよびALTのレベルはすべて正常な限界であった。加えて、血液細胞の数、すなわち、ヘマトクリット、白血球細胞、リンパ球、単核細胞、セグメント化好中球および好酸球等は異常な範囲でなかった。また、CD4/CD8表現細胞の比率も正常な範囲であった。

また、最後の投与後10日目のLFA3 TTPスラリーレベルは当該濃度の投与の直後のLFA3 TTPレベルの約2%であり、マウスのモノクローナルにおいて一般に見られる半減期よりもはるかに長かった。

また、CD4およびCD8表現細胞の世光ラベにより、約10%のCD4<sup>+</sup>細胞および約90%のCD8<sup>+</sup>細胞が最後の投与から10日後において依然としてLFA3 TTPにより被覆されていることがわかった。

#### 実験例4

ヒトの心臓の同種移植モデル

たヒビ（体重32kg）に5mg/kgの投薬量で1日に開始して、移植前2日間続けて投与した。3日後、心臓のヘテロトピックな同種移植を3kgの若いヒビから得た心臓を用いて行った。当該移植の日に5mg/kgの1E6の1頭の投薬を行い、その後、10日間続けて1日に1回この投与を行った。また、胸腔サンプルを当該投与に先立って移植の2日前に採取した。さらに、移植血液サンプルを移植と同時に、また、それから5日、10日目、15日目、19日目および21日目に行った。次に、1E6の全血漿レベルおよび血液濃度における低値な1E6の比率、すなわち、シドナー8に結可能な1E6のパーセントのアッセイを実験例2Cにべたように行った。当該ヒビには一般的な免疫抑制剤がなんら投与されていない。

その後、移植腔を毎日観察し、心臓の鼓動を触診および目視により評価してモニターした。さらに、心電図を1回取った。また、移植腔内心電バイオプシーを移植16日目に行った。この結果、上述の血液サンプルに

は当たり5mg/kgの投薬量で投与した。3日後に、同様のヘテロトピックな同種移植を若いヒビから得た心臓を用いて行った。なお、当該移植の日に5mg/kgのシドナー3T1Pを1頭投与し、その後、9日間続けて日に1回この投与を行った。

その後の血液サンプルの採取および分析、および同種移植の拒絶反応の評価を実験例4Aと実験例同一に行っ

この結果、当該シドナー3T1Pで処理したヒビにおける同種組織の生存期間が実験例のヒビにおいて生存した移植組織に比して延長し、当該シドナー3T1Pによる移植組織の拒絶性が向上することがわかった。

本発明において有用なマウスのハイブリドーマ細胞抗体は1991年3月5日にブダペスト条約に基きアメリカンクイブカルチャーコレクション（Rockville, Maryland, USA）に寄託された。以下により開示され、以下の如く固定される。

表題名 ATCC受入番号

1E6 HB 10A49

05-17（1999）。なお、当該拒絶システムの目的に対応して、心臓の鼓動および心電図の評価による鼓動の停止とさらに、心筋筋のリンパ管の異所的浸潤、液体の生成、および、ドナーの末梢血減りる反応をモニターした。その結果、免疫抑制5日以上当該システムにおいて移植組織がはその拒絶レベルが向上したことを示す。1E6処置したヒビにおいては、移植した心臓が当該移植後23日において鼓動とした。したがって、度1E6は心臓の同種移植に及ぼす拒絶性の改善をもたらす。

# B. シドナー3T1P処理

実験例4Aにおいて述べたものと実質的により、心臓同種移植の拒絶反応についてのPの知照を評価した。すなわち、併製したP（同上）を1頭の成育したヒビに移植前

（E. coli）J A 2-21は1991年ブダペスト条約に基づきアメリカンクイブコレクション（Rockville, Maryland, USA）に寄託され、以下の如く固定される。

表題名 ATCC受入番号

PSAB152 88720

トランスメンブランシドナー8をコードのキャリアであるバクテリオファージは月28日にブダペスト条約に基づきインビテック（In Vitro International, Inc., Lincoln, Nebraska, USA）に寄託された。その後、当該E1年8月20日にアメリカンクイブカルションに移され、以下の如く固定される。

表題名 ATHT13 [xg110/LFA-3]

P1選別シドナー3をコードするプラス質転換した大腸菌（E. coli）は19

1) DNA シーケンス

2) SEQ ID NO: 2 トランスノンプラン LFA

3) アミノ酸シーケンス

4) SEQ ID NO: 3 PI 連結 LFA-3 の DNA シーケンス

5) SEQ ID NO: 4 PI 連結 LFA-3 の アミノ酸シーケンス

6) SEQ ID NO: 5 CD2 の DNA シーケンス

7) SEQ ID NO: 6 CD2 の アミノ酸シーケンス

8) SEQ ID NO: 7 LFA3T1P の DNA シーケンス

9) SEQ ID NO: 8 LFA3T1P の アミノ酸シーケンス

- > 如く本発明の数多くの実施態様を説明したが、
- > 基本的実施態様は変更可能であり、したがって、
- > 手法を利用する他の実施態様を当該変更によっ

コンピュータ読取可能形態

- A) 媒体種: フロッピーディスク
- B) コンピュータ: IBM PC 互換機
- C) オペレーティング システム: PC-DOS
- D) ソフトウェア: Patent In Release #1.0, Version #1.35

在の出願データ

- A) 出願番号:
- B) 出願日:
- C) 分類:

れまでの出願データ

- A) 出願番号: US 07/772,705
- B) 出願日: 1991年10月7日

理人 (ATTORNEY/AGENT) 情報

- A) 氏名: Haley, Jr., James

5) 発明者: 27,704

(1) 一般情報

(I) 出願人: WALLNER, Barbara BENJAMIN, Christopher D.

(II) 発明の名称: LFA-3 または CD2 結合の設計による付随移植または異種移植の寛容性あるための方法

(III) シーケンス数: 8

(IV) 通信アドレス

(A) アドレス: c/o FISH & E

(B) ストリート: 875 Third Avenue

(C) 市: ニューヨーク

(D) 州: ニューヨーク

(E) 国: U. S. A.

(F) ZIP: 10022

(2) SEQ ID NO: 1 の情報

(I) シーケンス特性

- (A) 長さ: 758 塩基対
- (B) 種類: 核酸
- (C) 構成: 一本鎖
- (D) トポロジー: 線形

(IX) 特徴

- (A) NAME/KEY: CDS
- (B) LOCATION: 1..750

(IX) 特徴

- (A) NAME/KEY: sig\_peptide
- (B) LOCATION: 1..84

(IX) 特徴

- (A) NAME/KEY: main\_peptide
- (B) LOCATION: 85..750

(IX) 特徴

- (A) NAME/KEY: misc\_feature

2 GTC GTC GGC AGC GAC GCG GCG GCG GCG GTC GCG GTC GTC AGC GTC 46  
 Val Ala Gly Ser Asp Ala Gly Arg Ala Leu Gly Val Leu Ser Val  
 23 20 15  
 3 TGC GTC GTC GAC TGC TTT GGT TGC ATC AGC GGT TTT TGC GAA GAA 96  
 Cys Leu Leu His Cys Phe Gly Phe Ile Ser Cys Phe Ser Gln Gln  
 10 5  
 4 TAT GGT GTT GTT TAT GCG AAT GTA AGT TTC GAT GTA GCA AGC AAT 124  
 Tyr Gly Val Val Tyr Gly Asp Val Thr Phe His Val Phe Ser Asp  
 10 15 20  
 5 CGT TTA AAA GAG GTC CTA TGT AAA AAA GAA AAG GAT AAT TTT GCA 192  
 Pro Leu Lys Gln Val Leu Trp Lys Lys Gln Lys Asp Lys Val Ala  
 25 30 35  
 6 CTC GAA AAT TGT GAA TTC AGA GGT TTC TCA TGT TTT AAA AAT AGC 260  
 Leu Gln Asn Ser Gln Phe Arg Ala Phe Ser Ser Phe Lys Asn Arg  
 40 45 50  
 7 TAT TTA GAC AGT CTC TCA GGT AGC CTC AGT ATC TAC AAG TTA ACA 288  
 Tyr Leu Asp Thr Val Ser Gly Ser Leu Thr Ile Tyr Asn Leu Thr  
 55 60 65  
 8 TCA GAT GAA GAT GAG TAT GAA ATC GAA TCC GTC AAT ATT ACT GAT 324  
 Ser Asp Gln Asp Gln Tyr Gln Met Gln Ser Pro Asn Ile Thr Asp  
 70 75 80  
 9 AIC AAG TTC TTT CTC TAT GTC GTT GAC TCT GTT GCA TCT GCG ACA 360  
 Met Lys Phe Phe Lac Tyr Val Leu Gln Ser Leu Pro Ser Pro Thr  
 85 90 95 100

TTA TTT AAT ACA ACA TCA TCA ATC ATT TTC AGA AGC TGT ATC G 184  
 Leu Phe Asn Thr Thr Ser Ser Ile Ile Leu Thr Thr Cys Ile P  
 185 190 195  
 AGG GGT GAT TCA ACA GAC AGA TAT GCA GTT ATA GCG ATA GCA T 200  
 Ser Gly Ala Ser Arg His Arg Tyr Ala Leu Ile Pro Ile Pro I  
 205 210 215  
 GTA ATT ACA ACA TGT ATT GTC GTT TAT ATT AAT GGT ATT GTT A 220  
 Val Ile Thr Thr Cys Phe Val Leu Tyr Met Asn Gly Ile Leu I  
 225 230 235  
 GAC AGA AAA GCA GAC AGA AGC AAG TCC AAT TCA 240  
 Asp Arg Lys Pro Asp Arg Thr Asn Ser Asn  
 245 250 255

## SEQ ID NO: 2 の情報

### 1) シーケンス特性

- (A) 長さ: 250 アミノ酸
- (B) 種類: プミノ酸
- (C) トポロジー: 線形

### 2) 分子の相対: 蛋白質

#### 1) シーケンス配列: SEQ ID NO: 2

Met Val Ala Gly Ser Asp Ala Gly Arg Ala Leu Gly Val Leu Ser Val 1  
 23 20 15  
 Val Cys Leu Leu His Cys Phe Gly Phe Ile Ser Cys Phe Ser Gln Gln 10  
 5  
 Ile Tyr Gly Val Val Tyr Gly Asp Val Thr Phe His Val Pro Ser Asn 18  
 15 20  
 Val Pro Leu Lys Gln Val Leu Trp Lys Lys Gln Lys Asp Lys Val Ala 25  
 30 35

Gln Leu Gln Asn Ser Gln Phe Arg Ala Phe Ser Ser Phe Lys A 40  
 45 50  
 Val Tyr Leu Asp Thr Val Ser Gly Ser Leu Thr Ile Tyr Asn L 55  
 60 65  
 Ser Ser Asp Gln Asn Gln Tyr Gln Met Gln Ser Pro Asn Ile T 70  
 75 80  
 Thr Met Lys Phe Phe Leu Tyr Val Leu Gln Ser Leu Pro Ser P 85  
 90 95  
 Leu Thr Cys Ala Leu Thr Asn Gly Ser Ile Gln Val Gln Cys M 100  
 105 110  
 Pro Gln His Tyr Asn Ser His Arg Gly Leu Ile Met Tyr Ser T 115  
 120 125  
 Cys Pro Met Gln Gln Cys Lys Arg Asn Ser Thr Ser Ile Tyr P 130  
 135 140  
 Met Gln Asn Asp Leu Pro Gln Lys Ile Gln Cys Thr Leu Ser A 145  
 150 155  
 Leu Phe Asn Thr Thr Ser Ser Ile Ile Leu Thr Thr Cys Ile P 160  
 165 170  
 Ser Gly His Ser Arg His Arg Tyr Ala Leu Ile Pro Ile Pro L 175  
 180 185  
 Val Ile Thr Thr Cys Ile Val Leu Tyr Met Asp Gly Ile Leu L 190  
 200 205  
 Asp Arg Lys Pro Asp Arg Thr Asn Ser Asn 210  
 215 220

A) NAME/KEY: CDB

B) LOCATION: 1...720

A) NAME/KEY: sig\_peptid

B) LOCATION: 1...84

A) NAME/KEY: msa\_peptid

B) LOCATION: 85...720

A) NAME/KEY: misc\_featu

B) LOCATION: 1...720

(D) 種の情報: /n o t e - " H u m b e r P  
n k e d L F A - 3 "

(A) NAME/KEY: misc\_featu

G CAG GAA TGT AAA GGT AAC TCA AGC AGT ATA TAT TTT AAG 528  
G Gln Gln Cys Lys Arg Ala Ser Thr Ser Ile Tyr Phe Tyr  
5 140 145

T GAT GTT CCA GAA AAA ATA CAG TGT ACT GTT AGC AAT CCA 536  
A Asp Leu Pro Gln Lys Ile Gln Cys Thr Leu Ser Asn Pro  
155 160

T ACA ACA TCA TCA ATG ATT TTG ACA ACC TGT ATC CCA AGC 624  
D Thr Thr Ser Ser Ile Ile Leu Thr Thr Cys Ile Pro Ser  
170 175 180

T TCA AAA CAG ACA TAT CCA GTT ATA GCG ATA CCA TTA CCA 632  
S Ser Arg His Arg Tyr Ala Leu Ile Pro Ile Pro Leu Ala  
185 190 195

A ACA TGT ATT CCG CCG TAT ATG AAT GGT ATG TAT GGT TTT 720  
P Thr Cys Ile Val Leu Tyr Gln Asn Gly Met Tyr Ala Phe  
200 205 210

528

536

624

632

720

723

ATG GAT GGT GGG AUC UAC GAG GAG GAG GAG GAG GAG GAG GAG 120  
Met Val Ala Gly Ser Asp Ala Gly Arg Ala Leu Gly Val Leu Ser  
215 220 225

ATG GCG GCG GCG CAG TGC TTC GGT TTC ATG AGC AGC TGT TTT TCG CAA 130  
Val Cys Leu Leu His Cys Phe Gly Phe Ile Ser Cys Phe Ser Gln  
230 235 240

ATA TAT GGT GGT GTC TAT GCG AAT GTA ACT TTC CAT CCA CCA AGC 140  
Ile Tyr Gly Val Val Tyr Gly Asn Val Thr Phe His Val Pro Ser  
245 250 255

CTG GGT TTA AAA CAG GTC CCA TCG AAA AAA CAA AAG GAT AAA GTC 150  
Val Pro Leu Tyr Gln Val Leu Trp Lys Lys Gln Lys Asp Lys Val  
260 265 270

GAA CTG GAA AAT TGT GAA TTC ACA GGT TTC TCA TGT TTT AAA AAT 160  
Gln Leu Gln Asn Ser Gln Phe Arg Ala Phe Ser Ser Phe Lys Met  
275 280 285

GTG TAT TTA GAC AAT CTC TCA GGT AGC CTC ACT ATC TAC AAG TTT 170  
Val Tyr Leu Asp Thr Val Ser Gly Ser Ser Thr Ile Tyr Asn Leu  
290 295 300

TCA TCA GAT CAA GAT GAG TAT GAA ATG GAA TCG CCA AAT ATT AC 180  
Ser Ser Asp Gln Asp Gln Tyr Gln Met Gln Ser Pro Asn Ile Thr  
305 310 315

AGC ATG AAG TTC TTT GTT TAT CTC ATT GAG TGT CTT CCA TGT CC 190  
Thr Met Lys Phe Phe Leu Tyr Val Leu Gln Ser Leu Pro Ser Trp  
320 325 330

CCT ACT TGT CCA TTG ACT AAT CCA AGC ATT CAA CTC CAA TCG AT 200  
Leu Thr Cys Ala Leu Thr Asn Gly Ser Ile Gln Val Gln Cys Met  
335 340 345

CCA CAG CAT TAC AAC AGC GAT CCA CCA GTC ATA ATG TAC TCA TT 210  
Pro Gln His Tyr Asn Ser His Arg Gly Leu Ile Met Tyr Ser Trp  
350 355 360

(2) SEQ ID NO: 4 の情報

(1) シーケンス特性

(A) 長さ: 240 アミノ酸

(B) 種類: アミノ酸

(C) トポロジー: 線形

(II) 分子の種類: 蛋白質

(X1) シーケンス配列: SEQ ID NO:

Met Val Ile Gly Ser Asp Ala Gly Arg Ala Leu Gly Val Leu 215  
220 225

Val Cys Leu Leu His Cys Phe Gly Phe Ile Ser Cys Phe Ser 230  
235 240

Ile Tyr Gly Val Val Tyr Gly Asn Val Thr Phe His Val Pro 245  
250 255

Val Pro Leu Lys Gln Val Leu Trp Lys Lys Gln Lys Asp Lys 260  
265 270

Gln Leu Gln Asn Ser Gln Phe Arg Ala Phe Ser Ser Phe Lys 275  
280 285

Val Tyr Leu Asp Thr Val Ser Gly Ser Leu Thr Ile Tyr Asn 290  
295 300

Ser Ser Asp Gln Asp Gln Tyr Gln Met Gln Ser Pro Asn Ile 305  
310 315

1. AAG AAT ATT GAA GAA TTC AGA AAA GAG AAA GAG ACT TTC AAG GAA  
 2. Lys Lys Ile Ala Asp Phe Asn Lys Glu Lys Glu Thr Phe Lys Glu  
 3. 43 50 58



アンチセンス (ANTI-SENSE) : 図 (N

特徴

(A) NAME/KEY: CDS

(B) LOCATION: 1..1041

特徴

(A) NAME/KEY: sis-peptide

(B) LOCATION: 1..84

特徴

(A) NAME/KEY: mat-peptide

(B) LOCATION: 85..1041

特徴

(A) NAME/KEY: misc-feature

(B) LOCATION: 1..1041

TAA AAA GAG CTC CTA TCG AAA AAA CAA AAC GAT AAA CTC GCA  
 Lau Lys Glu Val Leu Trp Lys Lys Gln Lys Asp Lys Val Ala  
 15 35 15

CAA AAT TCT GAA TTC AGA CCT CTC TCA TTT TTT AAA AAC AGG  
 Glu Asn Asp Gln Phe Arg Ala Phe Ser Ser Phe Lys Asn Arg  
 40 65 30

TTA GAC ACT CTC TTA CCT AAG CTC ACT ATC TAC AAC TTA AAT  
 Leu Asp Thr Val Ser Gly Ser Leu Thr Ile Tyr Asn Ser Thr  
 55 80 65

GAT CAA GAT GAG TAT GAA ATC GAA TCG CAA AAT ATT ACT GAT  
 Asn Glu Asp Gln Tyr Glu Met Glu Ser Pro Asn Ile Thr Asp  
 70 95 80

AAC TTC TTT CTT TAT CTC GAG AAA ACT CAC AGA TCG CAA CCG  
 Lys Phe Phe Leu Tyr Val Asp Lys Thr Met Thr Cys Pro Pro  
 90 115 100

GCA CCG CAA CTC CTC CCG CCA CCG TCA CTC TTC CTC TTC CCG  
 Ala Pro Glu Gln Leu Glu Gly Phe Ser Val Phe Leu Phe Pro  
 105 130 115

CCG AAC GAG ACG CTC ATC ATC TCG CCG ACG CCT GAG CTC ACA  
 Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr  
 120 145 130

CTC GTC GAC CTC ACG CAC GAA GAC CCT GAG CTC AAC TTC AAC  
 Val Val Arg Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn  
 135 160 145

CTC GAC GTC GTC CAC GTC GAT AAT CCG AAC ACA AAT CCG CCG  
 Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg  
 155 180 160

CAG TAC AAC ACG ACG TAC CCG CTC GTC ACG CTC CTC ACG CTC  
 Glu Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val  
 175 200 180

GAG GAC TCG CTC AAT CCG AAC GAT TAC AAC TCG AAC CTC TCG  
 Glu Asp Trp Leu Asn Gly Leu Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser  
 185 210 195

CGC CTC GCA CCG CCG ATC CAG AAA ACG ATC TCG AAA CCG AAA  
 Ala Glu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys  
 220

ATC CTT CCG CCG AAC CAC CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG  
 Ile Val Ala Gly Ser Asp Ala Gly Arg Ala Leu Gly Val Leu  
 235 255 270

CTC TCG CCG CCG CAC TCG TTT CCG TTC ATC ACG TCG TTT T  
 Val Cys Leu Leu Phe Cys Phe Gly Phe Ile Ser Cys Phe Ser  
 285 305 320

ATA TAT CCG CTT CTC TAT CCG AAT GCA ACT TTC CAT GTA C  
 Ile Tyr Gly Val Val Tyr Gly Asn Val Thr Phe His Val Phe  
 315 340 355

TAT CCG AAC CAC ATC CCG CTC GAG TCG CAC ACG AAT CCG CCG C  
 Tyr Pro Ser Asp Phe Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro C  
 245 265 280 300

AAC AAC TAC AAC ACT ACG CTT CCG CTC CTC GAC TCG CAC CCG TCG T  
 Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser P  
 315 340 355 370 385

TTC CTC TAC ACG AAC CTC ACT CTC CAC AAC AAT ACG TCG CAC CCG C  
 Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln G  
 390 415 430 445 460

AAC CTC TTC TCA TCG TCG CTC ATC CAT GAG CCG CTT CAC AAC CAC T  
 Asn Val Thr Ser Cys Ser Val Met Met Glu Ala Leu His Asn His T  
 475 500 515 530 545

AAC CAG AAT ACG CTC CCG CTC TCT CTT CTT AAA TACATCCCG  
 Thr Glu Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 555 580 595

Val Ala Gly Ser Asp Ala Gly Arg Ala Leu Gly Val Leu Ser Val  
23 22 43

Cys Leu Leu His Cys Phe Gly Phe Ile Ser Cys Phe Ser Glu Glu  
10 4

Tyr Gly Val Val Tyr Gly Asp Val Thr Phe His Val Pro Ser Asn  
10 31 20

Phe Leu Lys Glu Val Leu Trp Lys Lys Glu Lys Asp Lys Val Ala  
23 30 35

Leu Glu Asn Ser Glu Phe Arg Ala Phe Ser Ser Phe Lys Asn Arg  
40 34 50

Tyr Leu Asp Thr Val Ser Gly Ser Leu Thr Ile Tyr Asn Leu Thr  
55 60 65

Ser Asp Glu Asp Glu Tyr Glu Met Glu Ser Pro Asn Ile Thr Asp  
20 75 40

Met Lys Phe Phe Leu Tyr Val Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Phe  
50 95 100

165 190 195  
Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala L  
200 201 220  
Gly Glu Pro Arg Glu Pro Glu Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg A  
215 220 225  
Glu Leu Thr Lys Asn Glu Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly H  
230 235 240  
Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Glu Pro G  
245 250 255  
Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser K  
265 270 275  
Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Glu Glu G  
280 285 290  
Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His T  
295 300 305  
Thr Glu Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
310 315

FIG. 1

T細胞系群B細胞の活性アッセイ  
ヒヒB (1E6)

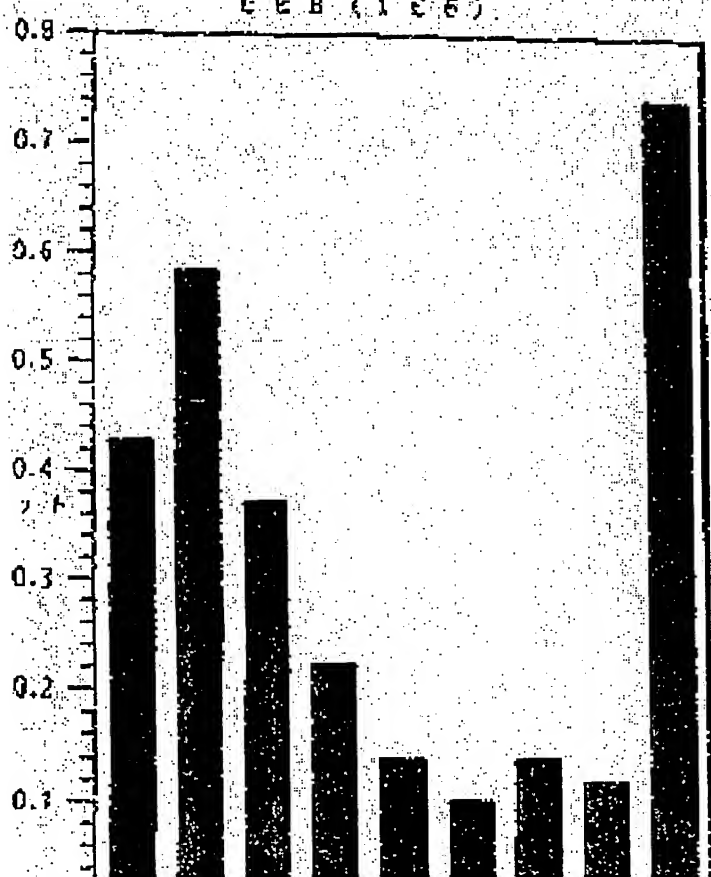
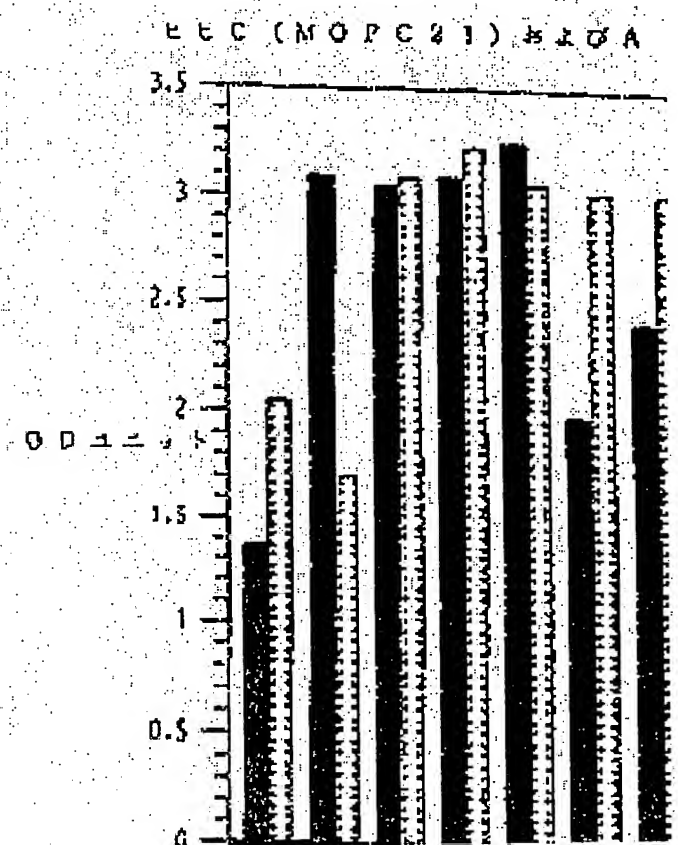


FIG. 2

T細胞系群B細胞の活性アッセイ



刊の名称 特定種のLFA-3またはCD2結合蛋白質を投与すること  
による同種移植または異種移植の寛容性を改善するための方  
法

刊出願人

上 所 アメリカ合衆国 02142 マサチューセッツ州  
ケインブリッジ ケインブリッジ センター 14  
名 称 バイオゲン インコーポレイテッド

通人

住 所 〒105 東京都港区虎の門1丁目2番3号  
虎の門第1ビル5階  
電話 03 (3504) 3075 (代)  
氏 名 弁理士 (8380) 三 好 秀 和

正審の提出年月日 1993年11月3日

付審類の目録

補正書の翻訳文

1頁

補正書の翻訳文提出書  
(特許法184条の8)

平成5年 4月 7日

官 報

の表示 PCT/US92/08734

の名称 特定種のLFA-3またはCD2結合蛋白質を投与すること  
による同種移植または異種移植の寛容性を改善するための方  
法

出願人

所 アメリカ合衆国 02142 マサチューセッツ州  
ケインブリッジ ケインブリッジ センター 14  
名 称 バイオゲン インコーポレイテッド

人

所 〒105 東京都港区虎の門1丁目2番3号  
虎の門第1ビル5階  
電話 03 (3504) 3075 (代)  
名 弁理士 (8380) 三 好 秀 和

の提出年月日 1993年11月5日

unol. Reviews, 117, pp.  
2 (1990)), Mauer, 「T細胞  
: 30 kD T11 抗原血症受容体蛋白質の  
役割」 (Cell, 36, pp. 807-  
84)), Sanchez-Madrid  
- リンパ球- 樹状細胞の相互作用を伴う三種の  
LFA-1, LFA-2 および LFA-3  
Natl. Acad. Sci. USA, 7  
489-98 (1982)), Bromb  
transplantation, 61, p  
225 (1981), EP 0 260  
.

(原文第63Aおよび第67ページの補正文)

47. LFA-3 または CD2 結合蛋白質  
を特徴とする人間を含む哺乳動物に移植し  
殖または異種移植組織の寛容性を改善する  
48. 前記 LFA-3 結合蛋白質が可溶性  
ペプチドであることを特徴とする請求項4  
項。

49. 前記 LFA-3 結合蛋白質がモノク  
LFA-3 抗体であることを特徴とする請  
求項の医薬。

50. 受入番号 ATCC HB 1069  
ATCC HB 10694 (HC-1 B  
CC HB 10695 (TAB), AT  
10696 (SBB) を有するハイブリド  
されるハイブリドーマにより生成されるか  
モノクローナル抗体 T52/9 であること  
請求項43に記載の医薬。

51. 前記 CD2 結合蛋白質がモノクロー  
2 抗体であることを特徴とする請求項47

する請求項４７に記載の医薬。

前記結合蛋白質がＦαβフラグメント、Ｆεγ  
メント、Ｆ（αβ）：フラグメント、Ｆ（γ）  
メントおよび前記抗原とＡ－３または抗ＣＤ２モ  
ーナル抗体の完全な免疫グロブリンＨ鎖から選択  
ことを特徴とする請求項４９に記載の医薬。

前記結合蛋白質がＬＦＡ－３結合蛋白質、ＣＤ２  
蛋白質および薬剤から成る群から選択される１種以  
上に連続することを特徴とする請求項４７に記載  
。

前記結合蛋白質が人間の免疫グロブリンＨ鎖のヒ  
スチジンおよび不飽和領域またはこれらの一部分に連続し  
たＬＦＡ－３ポリペプチドであることを特徴とす  
項５７に記載の医薬。

前記可溶性ＬＦＡ－３ポリペプチドがSEQ ID  
NO: 2のAA、-AA...、SEQ ID NO:  
AA、-AA...、SEQ ID NO: 2のAA...  
...、SEQ ID NO: 2のAA...-AA...か

国 際 特 許 公 報

Pub. No. 92/00715

Title of Invention A 41 K 37:02 A 61 K 33/35 1/1A 61 K 37:02 39:393	
Inventor Name Address City Country	
Attorney Name Address City Country	
Date of Filing Date of Publication Date of Priority	
Class of Invention Class of Invention Class of Invention	
Abstract Summary of the Invention Summary of the Invention	
Claims Claim 1 Claim 2 Claim 3 Claim 4 Claim 5 Claim 6 Claim 7 Claim 8 Claim 9 Claim 10 Claim 11 Claim 12 Claim 13 Claim 14 Claim 15 Claim 16 Claim 17 Claim 18 Claim 19 Claim 20 Claim 21 Claim 22 Claim 23 Claim 24 Claim 25 Claim 26 Claim 27 Claim 28 Claim 29 Claim 30 Claim 31 Claim 32 Claim 33 Claim 34 Claim 35 Claim 36 Claim 37 Claim 38 Claim 39 Claim 40 Claim 41 Claim 42 Claim 43 Claim 44 Claim 45 Claim 46 Claim 47 Claim 48 Claim 49 Claim 50 Claim 51 Claim 52 Claim 53 Claim 54 Claim 55 Claim 56 Claim 57 Claim 58 Claim 59 Claim 60 Claim 61 Claim 62 Claim 63 Claim 64 Claim 65 Claim 66 Claim 67 Claim 68 Claim 69 Claim 70 Claim 71 Claim 72 Claim 73 Claim 74 Claim 75 Claim 76 Claim 77 Claim 78 Claim 79 Claim 80 Claim 81 Claim 82 Claim 83 Claim 84 Claim 85 Claim 86 Claim 87 Claim 88 Claim 89 Claim 90 Claim 91 Claim 92 Claim 93 Claim 94 Claim 95 Claim 96 Claim 97 Claim 98 Claim 99 Claim 100	

Title of Invention A 41 K 37:02 A 61 K 33/35 1/1A 61 K 37:02 39:393	
Inventor Name Address City Country	
Attorney Name Address City Country	
Date of Filing Date of Publication Date of Priority	
Class of Invention Class of Invention Class of Invention	
Abstract Summary of the Invention Summary of the Invention	
Claims Claim 1 Claim 2 Claim 3 Claim 4 Claim 5 Claim 6 Claim 7 Claim 8 Claim 9 Claim 10 Claim 11 Claim 12 Claim 13 Claim 14 Claim 15 Claim 16 Claim 17 Claim 18 Claim 19 Claim 20 Claim 21 Claim 22 Claim 23 Claim 24 Claim 25 Claim 26 Claim 27 Claim 28 Claim 29 Claim 30 Claim 31 Claim 32 Claim 33 Claim 34 Claim 35 Claim 36 Claim 37 Claim 38 Claim 39 Claim 40 Claim 41 Claim 42 Claim 43 Claim 44 Claim 45 Claim 46 Claim 47 Claim 48 Claim 49 Claim 50 Claim 51 Claim 52 Claim 53 Claim 54 Claim 55 Claim 56 Claim 57 Claim 58 Claim 59 Claim 60 Claim 61 Claim 62 Claim 63 Claim 64 Claim 65 Claim 66 Claim 67 Claim 68 Claim 69 Claim 70 Claim 71 Claim 72 Claim 73 Claim 74 Claim 75 Claim 76 Claim 77 Claim 78 Claim 79 Claim 80 Claim 81 Claim 82 Claim 83 Claim 84 Claim 85 Claim 86 Claim 87 Claim 88 Claim 89 Claim 90 Claim 91 Claim 92 Claim 93 Claim 94 Claim 95 Claim 96 Claim 97 Claim 98 Claim 99 Claim 100	

PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES  
OF THE USA Vol. 87, No. 7, April 1990, WASHINGTON  
DC, US pages 2093 - 2607 S. KIMURA ET AL. 'Role  
of interaction of CD2 molecules with lymphocyte  
function-associated antigen 3 (LFA-3)  
recognition of antigenic antigen.'

4. Items 1-4  
between the 1st and 2nd pages, but for the 3rd page, the 1st and 2nd pages are not to be placed

5. Items 1-4 are to be placed on the 1st page of the 1st and 2nd pages, but for the 3rd page, the 1st and 2nd pages are not to be placed

6. Items 1-4 are to be placed on the 1st page of the 1st and 2nd pages, but for the 3rd page, the 1st and 2nd pages are not to be placed

7. Items 1-4 are to be placed on the 1st page of the 1st and 2nd pages, but for the 3rd page, the 1st and 2nd pages are not to be placed

8. Items 1-4 are to be placed on the 1st page of the 1st and 2nd pages, but for the 3rd page, the 1st and 2nd pages are not to be placed

9. Items 1-4 are to be placed on the 1st page of the 1st and 2nd pages, but for the 3rd page, the 1st and 2nd pages are not to be placed

10. Items 1-4 are to be placed on the 1st page of the 1st and 2nd pages, but for the 3rd page, the 1st and 2nd pages are not to be placed

11. Items 1-4 are to be placed on the 1st page of the 1st and 2nd pages, but for the 3rd page, the 1st and 2nd pages are not to be placed

12. Items 1-4 are to be placed on the 1st page of the 1st and 2nd pages, but for the 3rd page, the 1st and 2nd pages are not to be placed

13. Items 1-4 are to be placed on the 1st page of the 1st and 2nd pages, but for the 3rd page, the 1st and 2nd pages are not to be placed

☐ The 1st page of the 1st and 2nd pages, but for the 3rd page, the 1st and 2nd pages are not to be placed

☐ The 1st page of the 1st and 2nd pages, but for the 3rd page, the 1st and 2nd pages are not to be placed

14. Items 1-4 are to be placed on the 1st page of the 1st and 2nd pages, but for the 3rd page, the 1st and 2nd pages are not to be placed

For more details, see the 1st page of the 1st and 2nd pages, but for the 3rd page, the 1st and 2nd pages are not to be placed

2ページ続き

31. C1.0

識別記号

庁内整理番号

F I

61K 39/395

U 9284-4C

指定国

EP(AT, BE, CH, DE,

ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, M

(L, SE), AU, CA, JP, KR, US